

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07B 63/00, C07H 1/06, 19/20, 21/00, C07K 1/14, C25B 3/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/02399 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Januar 1998 (22.01.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01368 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Juni 1997 (28.06.97) (30) Prioritätsdaten: 196 28 171.7 12. Juli 1996 (12.07.96) DE 297 02 254.7 10. Februar 1997 (10.02.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nürnberger Strasse 69/71, D- 91052 Erlangen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR PURIFYING AND ENRICHING MOLECULES (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR AUFREINIGUNG UND ANREICHERUNG VON MOLEKÜLEN (57) Abstract <p>The invention concerns a method for cleaning and enriching first molecules (9) carrying charged particles such as proteins, nucleic acids and the like, comprising the following steps: a) preparing a solution containing the first molecules (9), b) bringing the solution in contact with an electrode (2) which is directly provided with a layer that has an affinity to the second molecules (4) containing the first molecules (9) and c) connecting the electrode (2) with a means (11) of producing an electric field so that in the solution a movement of the first molecule occurs, directed towards the electrode (2).</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung und Anreicherung von ladungstragenden ersten Molekülen (9), wie Proteinen, Nukleinsäuren und dgl., umfassend die folgenden Schritte: a) Bereitstellen einer die ersten Moleküle (9) enthaltenden Lösung, b) Inkontaktbringen der Lösung mit einer Elektrode (2), auf der unmittelbar eine Beschichtung mit einer Affinität zu den ersten Molekülen (9) aufweisenden zweiten Molekülen (4) vorgesehen ist und c) Verbinden der Elektrode (2) mit einem Mittel (11) zur Erzeugung eines elektrischen Felds, so daß in der Lösung eine in Bezug zur Elektrode (2) gerichtete Bewegung der ersten Moleküle (9) bewirkt wird.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Aufreinigung und Anreicherung von Molekülen

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufreinigung und Anreicherung von ladungstragenden ersten Molekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren und dgl..

Die Anreicherung von biologisch relevanten Molekülen, wie
10 Nukleinsäuren zur Durchführung analytischer Tests, bsp. der "polymerase chain reaction" (PCR), kann durch Fällen der Nukleinsäuren, durch Binden der Nukleinsäuren an eine geeignete Matrix, bsp. unter Verwendung einer Ionenaustauschersäule, sowie durch verschiedene Zentrifugationsverfahren er-
15 folgen. Die Selektion spezifischer Nukleinsäuren aus einem Nukleinsäuregemisch kann durch Anreicherung und Abtrennung in einem Gel, durch Hybridisation an Membranen oder durch das Komplexieren mit spezifischen Proteinen erfolgen. - Zur Aufreinigung von Proteinen werden ähnliche Verfahren herange-
20 zogen; dabei kommen auch Verfahren wie die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie antikörperabhängige Aufreinigungsverfahren zur Anwendung. Antikörperabhängige Verfahren verwenden oberflächenfixierte Moleküle, wie z.B. Latex-beads. - Die bekannten Verfahren haben den
25 Nachteil mangelnder Sensitivität und Geschwindigkeit. Außerdem ist deren Durchführung kostenaufwendig.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahren sowie eine entspre-
30 chende Vorrichtung bereitzustellen, mit denen die Nachteile nach dem Stand der Technik beseitigt werden. Außerdem sollen insbesondere Nukleinsäuren, Proteine und andere ladungstragende Moleküle von vorgegebenem Homologiegrad bzw. vorgegebener Bindungsaffinität aus einem großen Volumen anreicherbar
35 sein.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Patentansprüche 1 und 13 gelöst. Zweckmäßige Weiterbildungen ergeben sich aus den Merkmalen der Patentansprüche 2 - 12 sowie 14 - 35.

5

Nach der verfahrensseitigen Maßgabe der Erfindung wird die Aufgabe durch die folgenden Schritte gelöst:

- 10 a) Bereitstellen einer die ersten Moleküle enthaltenden Lösung,
- b) Inkontaktbringen der Lösung mit mindestens einer Elektrode, auf der unmittelbar eine Beschichtung mit einer Affinität zu den ersten Molekülen aufweisenden zweiten
15 Molekülen vorgesehen ist und
- c) Verbinden der Elektrode mit einem Mittel zur Erzeugung eines elektrischen Felds, so daß in der Lösung eine in
20 bezug zur Beschichtung gerichtete Bewegung der ersten Moleküle bewirkt wird.

Die Elektrode ist zweckmäßigerweise aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff hergestellt. Sie kann eine Schicht auf einem elektrisch nichtleitenden Kunststoffträgerstab oder
25 ein, vorzugsweise endständiger, Abschnitt eines solchen Kunststoffträgerstabs sein. Es ist auch möglich, den Kunststoffträgerstab vollständig aus elektrisch leitfähigem Kunststoff herzustellen und mit einem aus elektrisch nichtleitenden Kunststoff hergestellten Griffelement zu
30 versehen, das bspw. aufgesteckt sein kann.

Unter Einwirkung des elektrischen Felds wird der Effekt ausgenutzt, daß die in Lösung befindlichen ersten Moleküle, z.B. Nukleinsäure-Moleküle, eine Ladung tragen und somit im
35 elektrischen Feld bewegbar sind. Die durch die Einwirkung des

elektrischen Felds mit der Beschichtung in Kontakt getretenen oder in unmittelbare Nähe gelangten zweiten Moleküle können dort an die ersten Moleküle gebunden werden. Dabei kann als Bindung insbesondere eine ionische, kovalente, Wasserstoffbrücken- oder durch sterische Einflüsse hervorgerufene Bindung in Frage kommen. Während der Ausbildung dieser Bindung muß kein elektrisches Feld anliegen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist nicht nur dann anwendbar, wenn die ersten Moleküle sich in einer Lösung befinden: Es genügt, wenn sich die ersten Moleküle in einer Matrix, bspw. Gel, Fleisch oder dgl., sich befinden, die im elektrischen Feld eine Wanderung derselben ermöglicht.

Nach einer Ausgestaltung der Erfindung wird zur Erzeugung des elektrischen Felds eine erste Spannung an die Elektrode angelegt, so daß sie als Anode wirkt, an die eine negative Ladung tragende erste Moleküle, z.B. Nukleinsäure-Moleküle, so angezogen werden, daß eine Bindung an die zweiten Moleküle erreicht wird. Nach einer alternativen Ausgestaltung wird zur Erzeugung des elektrischen Felds eine erste Spannung an die Elektrode angelegt, so daß sie als Kathode wirkt, an die eine positive Ladung tragende erste Moleküle, z.B. Proteine, so angezogen werden, daß eine Bindung an die zweiten Moleküle erreicht wird.

Als besonders vorteilhaft wird angesehen, wenn insbesondere nach dem Binden der ersten an die zweiten Moleküle der folgende Schritt durchgeführt wird:

d₁) Umpolen und Anlegen einer zweiten Spannung, so daß die Elektrode als Kathode wirkt, von der eine negative Ladung tragende erste Moleküle, z.B. Nukleinsäuren, abgestoßen werden.

Alternativ dazu kann insbesondere nach dem Binden der ersten an die zweiten Moleküle der folgende Schritt durchgeführt werden:

- 5 d₂) Umpolen und Anlegen einer zweiten Spannung, so daß die Elektrode als Anode wirkt, von der eine positive Ladung tragende erste Moleküle, z.B. Proteine, abgestoßen werden.
- 10 Durch die Schritte lit. d₁) und d₂) kann ein Zusetzen der Beschichtung verhindert werden. Durch eine geeignet gewählte zweite Spannung ist es nämlich möglich, nicht an die Beschichtung gebundene Ladungsträger von der Beschichtung abzustößen und so den Zugang für weitere erste Moleküle zu
- 15 verbessern. Durch eine geeignete Erhöhung der zweiten Spannung können außerdem gezielt bestimmte ladungstragende erste Moleküle von der Beschichtung entfernt werden. Auf diese Weise kann auch eine Selektion bestimmter erster Moleküle erreicht werden. Dieser Vorgang ist als Stringenz
- 20 einer Hybridisationsreaktion für Nukleinsäuren bekannt.

Bei der Umpolung ist zu beachten, daß die Wanderung derjenigen ersten Moleküle, die eine Wechselwirkung mit den zweiten Molekülen eingegangen sind bzw. mit diesen hybridisieren,

25 eingeschränkt ist. Der Grad dieser Behinderung ist von der Art und Anzahl der Wechselwirkungen, d.h. in erster Linie vom Grad der Homologie, der miteinander wechselwirkenden ersten und zweiten Moleküle bzw. deren Affinität abhängig. Erste Moleküle, die eine hohe Affinität bzw. Komplementarität zu

30 den zweiten Molekülen aufweisen, werden dabei am stärksten zurückgehalten.

Zweckmäßigerweise wird während und/oder nach dem Schritt lit. c der folgende Schritt durchgeführt:

e) Aufheizen der Elektrode oder der Lösung, so daß die ersten Moleküle thermisch in ihre Komponenten oder Untereinheiten, z.B. einzelsträngige Nukleinsäuren, dissoziiert oder denaturiert werden.

5

Diese Ausgestaltung ermöglicht bsp. das Aufschmelzen von an die Beschichtung angezogenen doppelsträngigen Nukleinsäuren und erleichtert somit die Bindung der Einzelstränge an bspw. in der Beschichtung vorgesehene komplementären Oligonukleotiden. Auch das Halten der Oberfläche bei einer bestimmten Temperatur leistet somit einen Beitrag zur Stringenz der Selektion bestimmter bindender erster Moleküle.

Zweckmäßigerweise wird insbesondere nach dem Schritt lit. d₁ bzw. d₂ der folgende Schritt durchgeführt:

f) Abkühlen der Elektrode oder der Lösung, so daß eine Bindung der ersten Moleküle, Komponenten und/oder Untereinheiten derselben an die zweiten Moleküle bewirkt wird.

Durch den Schritt lit. f wird die Bindung der ersten Moleküle, deren Komponenten oder Untereinheiten an die Beschichtung zusätzlich unterstützt.

25

Je nachdem welcher Art die ersten Moleküle sind, kann/können einer oder mehrere der Schritte lit. c - lit. e wiederholt werden.

Insbesondere während und/oder nach dem Schritt lit. d₁ bzw. d₂ ist es zweckmäßig, die Lösung vorzugsweise mechanisch zu durchmischen. Auf diese Weise wird die Entfernung von durch die Schritte lit. d₁ bzw. d₂ von der Elektrode abgestoßenen ersten Molekülen, Komponenten und/oder Untereinheiten unterstützt.

- Vorteilhafterweise werden die Maximalwerte der ersten und zweiten Spannung so gewählt, daß eine Degradierung durch Elektrolyse der ersten und zweiten Moleküle sowie der
- 5 Komponenten und/oder Untereinheiten vermieden wird. Daneben hat es sich als günstig erwiesen, den Maximalwert der zweiten Spannung so zu wählen, daß eine Trennung von zwischen den ersten Molekülen bzw. deren Komponenten oder Untereinheiten und den zweiten Molekülen gebildeten Bindungen vermieden wird.
- 10
- In Anpassung an die Art des anzureichernden bzw. aufzureinigenden ersten Moleküls können die Maximalwerte der ersten und/oder zweiten Spannung/en, die Dauer der Polung bzw. Umpolung und/oder die Temperatur der Elektrode in
- 15 Abhängigkeit von Parametern der Lösung, wie deren pH-Wert, Ionenleitfähigkeit, Konzentration an ersten Molekülen, Temperatur und dgl. vorzugsweise automatisch gesteuert werden.
- 20 Nach der vorrichtungsseitigen Lösung ist eine Vorrichtung zur Anreicherung von ladungstragenden in einer Lösung befindlichen ersten Molekülen, wie Nukleinsäuren, Proteinen und dgl., mit einer Elektrode vorgesehen, auf der unmittelbar eine Beschichtung mit einer Affinität zu den ersten Molekülen
- 25 aufweisenden zweiten Molekülen vorgesehen ist, und wobei die Elektrode mit einem Mittel zur Erzeugung eines elektrischen Felds verbunden ist, so daß in der Lösung eine in bezug zur Elektrode gerichtete Bewegung der ersten Moleküle bewirkbar ist.
- 30
- Damit wird eine Vorrichtung zur Durchführung des neuerungsgemäßen Verfahrens zur Verfügung gestellt, bei der das nachteilige Zusetzen der Beschichtung vermieden und ein Anreichern spezifischer Moleküle an einer Oberfläche bewirk-

bar ist. Die Elektrode ist einfach und billig herstellbar; sie kann daher als Einmalartikel verwendet werden.

Die Elektrode ist vorzugsweise aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff, insbesondere einem Polycarbonat, einem Polycarbon, Polycarbonat, Polycarbonat-Mischpolymerisat oder Homopolymerisat mit einem leitfähigen Zusatz, wie Graphit, hergestellt. Derartige elektrisch leitfähige Kunststoffe sind bsp. aus der DE 35 41 721 A1 bekannt, deren Inhalt hiermit einbezogen wird.

Das Mittel zur Erzeugung des elektrischen Felds kann ein Mittel zur Erzeugung eines elektrischen Wechselfelds sein. So kann eine schnelle und spezifische Belegung der Beschichtung mit den anzureichernden bzw. aufzureinigenden ersten Molekülen erzielt werden.

Je nachdem, ob das erste Molekül eine positive oder eine negative Ladung trägt, kann das Mittel zur Erzeugung des elektrischen Felds die Elektrode als Anode oder als Kathode umfassen.

Die als Elektrodenmaterial vorliegenden Kunststoffe lassen eine sehr einfache und damit kostengünstige Belegungsschemie (Hitoshi Kohsaka : J. Clin. Lab. Anal. 8:452-455 (1994)) für die die Selektionskriterien vorgebenden zweiten Moleküle zu. Die auf der Elektrode vorgesehene Beschichtung weist nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal mindestens einen aliphatischen Rest auf, der vorzugsweise über eine NH- oder SH-Bindung an die Elektrode gebunden ist. Der aliphatische Rest kann dabei eine Kettenlänge von 2 - 20, vorzugsweise von 6 - 10, Kohlenstoffatomen aufweisen. An das freie Ende des aliphatischen Rests ist zweckmäßigerweise eine Protein-, Peptid- oder eine Nukleotid-Sequenz gebunden. Die Nukleotid-Sequenz kann 5 - 30 Nukleotide umfassen. Dabei ist es

vorteilhaft, wenn die Nukleotid-Sequenz ein erstes Oligonukleotid ist, das aus einer Kette von 10 - 20, vorzugsweise von 15 Nukleotiden, gebildet ist. Als besonders vorteilhaft wird angesehen, an das erste Oligonukleotid, 5 vorzugsweise über eine Zuckerphosphat-Bindung, ein zweites Oligonukleotid zu binden.

Die Elektrode kann mit einem Heizelement versehen sein, das durch einen elektrischen Isolator von der Elektrode getrennt 10 ist. Der Isolator kann aus Glas oder Keramik, vorzugsweise aus Aluminiumoxid oder -nitrid, hergestellt sein. Bei dem Heizelement kann es sich um ein aus Platin hergestelltes Widerstandsheizelement handeln. Das Widerstandsheizelement kann in einer Ausgestaltung der Erfindung auch mit der 15 Elektrode identisch sein, da bei geeigneter Schaltung der im Vergleich zu den Zuleitungen hohe elektrische Widerstand der Kunststoffelektrode zur Erwärmung der Elektrodenoberfläche genutzt werden kann.

20 Um unerwünschte Moleküle von der Beschichtung abzuführen und eine Neuverteilung von aufzureinigenden und anzureichernden ersten Molekülen in der Lösung zu bewirken, ist zweckmäßigerweise ein Mittel zum Durchmischen der Lösung vorgesehen. Dabei kann es sich um einen elektrisch betreibbaren 25 Rührer oder um einen hindurchgeleiteten Gasstrom handeln.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung sind die elektrischen Größen zur Erzeugung des elektrischen Felds, zum Betrieb des Heizelements sowie des Mittels zum 30 Durchmischen in Abhängigkeit von Parametern der Lösung wie deren pH-Wert, Ionenleitfähigkeit, Konzentration an ersten Molekülen, Temperatur und dgl. vorzugsweise automatisch steuerbar. Zur automatischen Steuerung wird zweckmäßigerweise ein Computer zum Einsatz kommen.

Schließlich wird eine Zusammenstellung von Mitteln zur Herstellung der neuerungsgemäßen Vorrichtung und zur Durchführung des neuerungsgemäßen Verfahrens beansprucht.

5 Beispiel 1 - Aufbau der Beschichtung und des darunter befindlichen Körpers

Auf einen Trägerstab ist eine erste Isolationsschicht, die aus Glas oder Keramik, bsp. aus Aluminiumoxid, gebildet sein
10 kann, aufgebracht. Darauf ist eine leitfähige, bsp. in Form eines Platinmäanders hergestellte, Schicht zum Heizen aufgebracht. Die leitfähige Schicht ist wiederum mit einer dünnen zweiten Isolationsschicht abgedeckt. Sie kann eine Dicke von 150 µm aufweisen und aus Glas hergestellt sein.
15 Darauf befindet sich eine aus Gold gebildete Elektrode. Sie ist kontaktiert.

Auf der Elektrode ist die Beschichtung vorgesehen. Über SH-Gruppen sind an die Oberfläche der Elektrode C6 aliphatische
20 Linkermoleküle gebunden. An das freie Ende der Linkermoleküle sind jeweils Spacermoleküle, bsp. aus 10 Thymidinresten bestehende Oligonukleotide, gebunden. An deren freien Enden ist jeweils über eine Zuckerphosphat-Bindung 10 pmol eines 20-mer mit einer vorgegebenen Sequenz gebunden. Die mit der
25 Beschichtung versehene Elektrode wird üblicherweise in Kombination mit der beanspruchten Vorrichtung verwendet. Er kann aber auch ein gesonderter Neuerungsgegenstand sein.

Beispiel 2 - Aufreinigung

30

Die im Beispiel 1 beschriebene Elektrode wird in 1 ml einer 20 pmol radioaktiv markiertes Oligonukleotid (20-mer) und 40 pmol DNA-Einzelstränge enthaltenden Meßlösung eingetaucht. Das Oligonukleotid ist komplementär zu dem in der
35 Beschichtung gebundenen Oligonukleotid, die DNA-Einzelstränge

dagegen nicht. Für die mittels Cherenkov-Zählung ermittelte Aktivität der der Beschichtung werden die folgenden Werte beobachtet:

- 5 Wird an die Elektrode eine Spannung von 0,2 V und ein Strom vom 0,8 mA angelegt, so wird nach mehrmaligem Umpolen eine Bindung von 9% der Gesamtaktivität an die Beschichtung beobachtet. Bei zweiminütiger Schaltung der Elektrode als Anode ohne Umpolung beträgt die Bindung der Gesamtaktivität 2%. -
10 Ohne Anlegen einer Spannung werden weniger als 0,2% der Gesamtaktivität an die Beschichtung gebunden.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung erläutert. Hierin zeigen

15

Fig. 1 einen schematischen Querschnitt durch ein erstes Ausführungsbeispiel einer Elektrode,

20

Fig. 2 einen schematischen Querschnitt durch ein zweites Ausführungsbeispiel einer Elektrode,

Fig. 3 eine perspektivische Ansicht gemäß Fig. 1,

25

Fig. 4 eine perspektivische Ansicht eines Behälters mit Elektrode und Gegenelektrode,

Fig. 5 eine perspektivische Ansicht eines dritten Ausführungsbeispiels einer Elektrode.

- 30 Ein aus Teflon hergestellter Trägerstab 1 ist mit einer leitfähigen Schicht bzw. Elektrode 2, bestehend aus einem elektrisch leitfähigen Kunststoff, versehen. Die der Lösung (hier nicht dargestellt) zugewandte Fläche 3 der Elektrode 2 ist mit Oligonukleotiden 4 beschichtet. Innerhalb des
35 Trägerstabs 1 ist eine erste Leitung 5 eingegossen, die mit

der Elektrode 2 kontaktiert ist. Zwei weitere zweite Leitungen 6 (hier mit unterbrochener Linie dargestellt) können zum Beheizen ebenfalls mit der Elektrode 2 kontaktiert sein.

5

Bei dem in Fig. 2 gezeigten Ausführungsbeispiel ist zusätzlich zwischen der Elektrode 2 und dem Trägerstab 1 eine elektrische isolierende Zwischenschicht 7 vorgesehen. Sie trennt die Elektrode 2 von einer Heizschicht 8, die
10 unmittelbar auf dem aus Teflon hergestellten Trägerstab 1 vorgesehen ist.

Fig. 3 zeigt eine perspektivische Ansicht des in Fig. 1 beschriebenen Ausführungsbeispiels. Mit 9 sind in einer
15 Lösung befindliche ladungstragende erste Moleküle bezeichnet.

Fig. 4 zeigt das Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 3 in perspektivischer Ansicht. Der Trägerstab 1 taucht in eine in einem Behälter 10 aufgenommenen Lösung ein, in der sich erste
20 Moleküle 9 befinden. Die erste Leitung 5 ist mit einer Wechselspannungsquelle 11 verbunden. Ebenfalls mit der Wechselspannungsquelle 11 verbunden ist über eine dritte Leitung 12 eine in die Lösung eintauchende Gegenelektrode 13

25 Fig. 5 zeigt in perspektivischer Ansicht ein drittes Ausführungsbeispiel einer Elektrode. An der Spitze des aus isolierendem Kunststoff hergestellten Trägerstabs 1 befindet sich die Fläche 3 der Elektrode 2. Die eingegossene erste Leitung 5 ist mit einer ersten Anschlußbuchse 14 und die
30 zweiten Leitungen 6 jeweils mit zweiten Anschlußbuchsen 15 verbunden. In die Anschlußbuchsen 14 bzw. 15 können Stecker von Anschlußkabeln eingesteckt werden.

Die Funktion der Vorrichtung ist folgende:

Um Biomolekül-Proben aus einer Lösung zu gewinnen, wird eine erfindungsgemäße Vorrichtung in die Lösung getaucht. Sodann wird eine Spannung über die auf dem Trägerstab 1 vorgesehene Elektrode 2 und einer in die Lösung eintauchenden Gegenelektrode 13 angelegt. Das bewirkt je nach Polarisierung der Elektrode 2 eine elektrophoretische Wanderung von entgegengesetzt geladenen Biomolekülen in Richtung der Elektrode 2. Bei Erreichen der aus Oligonukleotiden 4 bestehenden Beschichtung werden diese daran gebunden.

10

Im Fall von doppelsträngiger DNA wird die Polarisierung der Elektrode 2 nach einem vorgegebenen Zeitabschnitt unterbrochen. Es findet dann ein Heizen der Elektrode 2 statt. Dadurch werden die an den Oligonukleotiden 4 anhaftenden DNA Doppelstränge in ihre Komponenten zerlegt. Die Einzelstränge werden durch Wiederaanlegen der Polarisierung an die Oligonukleotide 4 zurückbewegt und dort gebunden. Auf diese Weise können schnell und einfach Proben aus der Lösung gewonnen werden.

15

Bezugszeichenliste

	1	Trägerstab
	2	Elektrode
5	3	Fläche
	4	Oligonukleotide
	5	erste Leitung
	6	zweite Leitung
	7	Zwischenschicht
10	8	Heizschicht
	9	erste Moleküle
	10	Behälter
	11	Wechselspannungsquelle
	12	dritte Leitung
15	13	Gegenelektrode
	14	erste Anschlußbuchse
	15	zweite Anschlußbuchse

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung und Anreicherung von ladungstragenden ersten Molekülen (9), wie Proteinen,
5 Nukleinsäuren und dgl., umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Bereitstellen einer die ersten Moleküle (9) enthaltenden Lösung,
 - 10 b) Inkontaktbringen der Lösung mit einer Elektrode (2), auf der unmittelbar eine Beschichtung mit einer Affinität zu den ersten Molekülen (9) aufweisenden zweiten Molekülen (4) vorgesehen ist und
 - 15 c) und Verbinden der Elektrode (2) mit einem Mittel (11) zur Erzeugung eines elektrischen Felds, so daß in der Lösung eine in bezug zur Elektrode (2) gerichtete Bewegung der ersten Moleküle (9) bewirkt wird.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zur Erzeugung des elektrischen Felds eine erste Spannung an die Elektrode (2) angelegt wird, so daß sie als Anode wirkt, an die eine negative Ladung tragende erste Moleküle (9), z.B. Nukleinsäuren, so angezogen werden, daß eine Bindung an
25 die zweiten Moleküle (4) erreicht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zur Erzeugung des elektrischen Felds eine erste Spannung an die Elektrode (2) angelegt wird, so daß sie als Kathode wirkt, an die eine
30 positive Ladung tragende erste Moleküle (9), z.B. Proteine, so angezogen werden, daß eine Bindung an die zweiten Moleküle (4) erreicht wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei insbesondere nach dem Binden der ersten an die zweiten Moleküle (4) der folgende Schritt durchgeführt wird:
- 5 d₁) Umpolen und Anlegen einer zweiten Spannung, so daß die Elektrode (2) als Kathode wirkt, von der eine negative Ladung tragende erste Moleküle (9), z.B. Nukleinsäuren, abgestoßen werden.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 3, wobei insbesondere nach dem Binden der ersten (9) an die zweiten Moleküle (4) der folgende Schritt durchgeführt wird:
- 15 d₂) Umpolen und Anlegen einer zweiten Spannung, so daß die Elektrode (2) als Anode wirkt, von der eine positive Ladung tragende erste Moleküle (9), z.B. Proteine, abgestoßen werden.
- 20 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei insbesondere während und/oder nach dem Schritt lit. c der folgende Schritt durchgeführt wird:
- 25 e) Aufheizen der Elektrode (1) oder der Lösung, so daß die ersten Moleküle (3) thermisch in ihre Komponenten oder Untereinheiten, z.B. einzelsträngige Nukleinsäuren, dissoziiert oder denaturiert werden.
- 30 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei insbesondere nach dem Schritt lit. d₁ bzw. d₂ der folgende Schritt durchgeführt wird:
- 35 f) Abkühlen der Elektrode (2) oder der Lösung, so daß eine Bindung der ersten Moleküle (9), Komponenten, Untereinheiten und/oder an die zweiten Moleküle (4) bewirkt wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
einer oder mehrere der Schritte lit. c - lit. f wieder-
holt wird/werden.
- 5
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Lösung vorzugsweise mechanisch durchmischt wird.
- 10
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 - 9, wobei die
Maximalwerte der ersten und zweiten Spannung so gewählt
werden, daß eine durch Elektrolyse erfolgende
Degradierung oder Dissoziation der ersten (9) und zweiten
Moleküle (4) sowie der Komponenten und Untereinheiten
vermieden wird.
- 15
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 4 - 10,
wobei der Maximalwert der zweiten Spannung so gewählt
wird, daß eine Trennung von zwischen den ersten Molekülen
(9) bzw. deren Komponenten oder Untereinheiten und den
20 zweiten Molekülen (4) gebildeten Bindungen vermieden
wird.
- 25
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Maximalwerte der ersten und/oder zweiten Spannung/en,
die Dauer der Polung bzw. Umpolung und/oder die
Temperatur der Elektrode (2) in Abhängigkeit von
Parametern der Lösung, wie deren ph-Wert,
Ionenleitfähigkeit, Konzentration an ersten Molekülen
(9), Temperatur und dgl., vorzugsweise automatisch,
30 gesteuert wird.
- 35
13. Vorrichtung zur Anreicherung von ladungstragenden in
einer Lösung befindlichen ersten Molekülen (9), wie
Nukleinsäuren, Proteinen und dgl., mit einer Elektrode
(2) auf der unmittelbar eine Beschichtung mit eine

Affinität zu den ersten Molekülen (3) aufweisenden zweiten Molekülen (4) vorgesehen ist, und wobei die Elektrode (2) mit einem Mittel zur Erzeugung eines elektrischen Felds (11) verbunden ist, so daß in der
5 Lösung eine in bezug zur Elektrode (2) gerichtete Bewegung der ersten Moleküle (9) bewirkbar ist.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, wobei ein Behälter (10) zur Aufnahme einer die ersten Moleküle (9) enthaltenden
10 Lösung vorgesehen ist.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, wobei das Mittel (11) zur Erzeugung des elektrischen Felds ein Mittel zur Erzeugung eines elektrischen Wechselfelds ist.

15 16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei das Mittel (11) zur Erzeugung des elektrischen Felds die Elektrode (2) als Anode umfaßt.

20 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 - 16, wobei das Mittel (11) zur Erzeugung des elektrischen Felds die Elektrode (2) als Kathode umfaßt.

25 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 - 17, wobei die Elektrode (2) eine aus Gold, einer Gold/Platin- oder einer Platinlegierung hergestellt ist.

30 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 - 17, wobei die Elektrode (2) aus einem leitfähigen Kunststoff, wie einem Polycarbonat, Polycarbonat-Mischpolymerisat oder einem Homopolymerisat mit einem leitfähigen Zusatz, wie Graphit, hergestellt ist.

35 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 - 19, wobei die Beschichtung mindestens einen aliphatischen Rest auf-

weist, der vorzugsweise über eine NH- oder SH-Bindung an die Elektrode (2) gebunden ist.

- 5 21. Vorrichtung nach Anspruch 20, wobei der aliphatische Rest eine Kettenlänge von 2 - 20, vorzugsweise von 6 - 10, Kohlenstoffatomen aufweist.
- 10 22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, wobei an das freie Ende des aliphatischen Rests eine Protein- oder Peptidsequenz gebunden ist.
- 15 23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei an das freie Ende des aliphatischen Rests eine Nukleotid-Sequenz gebunden ist.
- 20 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, wobei die Nukleotid-Sequenz 5 - 30 Nukleotide umfaßt.
- 25 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei die Nukleotid-Sequenz ein erstes Oligonukleotid ist, das aus einer Kette von 10 - 20, vorzugsweise von 15 Nukleotiden, gebildet ist.
- 30 26. Vorrichtung nach Anspruch 25, wobei das erste Oligonukleotid, vorzugsweise über eine Zuckerphosphat-Bindung, an ein zweites Oligonukleotid gebunden ist.
- 35 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 26, wobei die Elektrode (2) auf einem Träger (1) vorgesehen ist.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 27, wobei der Träger (1) aus einem elektrisch isolierenden Material, vorzugsweise einem elektrisch isolierenden Kunststoff, hergestellt ist.

29. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 - 28, wobei die Elektrode (2) mit einem Heizelement (8) versehen ist, das durch einen elektrischen Isolator (6) von der Elektrode (2) getrennt ist.
- 5
30. Vorrichtung nach Anspruch 29, wobei der elektrische Isolator (6) aus Glas oder Keramik, vorzugsweise aus Aluminiumoxid oder -nitrid, hergestellt ist.
- 10
31. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche 13 - 30, wobei ein Mittel zum Durchmischen der Lösung vorgesehen ist.
- 15
32. Vorrichtung nach Anspruch 31, wobei das Mittel zum Durchmischen ein elektrisch betreibbarer Rührer ist.
- 20
33. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 - 32, wobei die elektrischen Größen zur Erzeugung des elektrischen Felds, zum Betrieb des Heizelements sowie des Mittels zum Durchmischen in Abhängigkeit von Parametern der Lösung wie deren pH-Wert, Ionenleitfähigkeit, Konzentration an ersten Molekülen (9), Temperatur und dgl., vorzugsweise automatisch, steuerbar sind.
- 25
34. Zusammenstellung von Mitteln zur Herstellung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 33.
35. Zusammenstellung von Mitteln zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

1/4

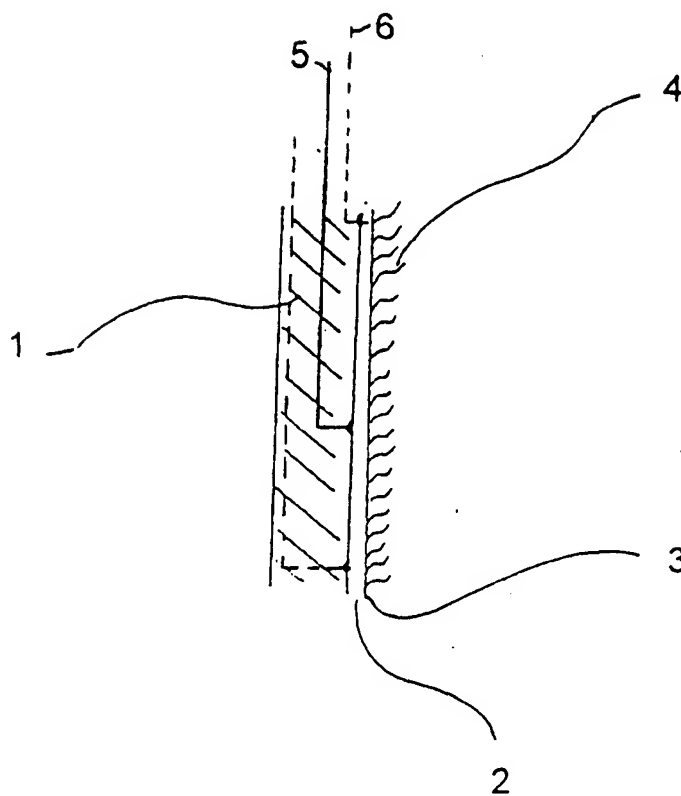


Fig. 1

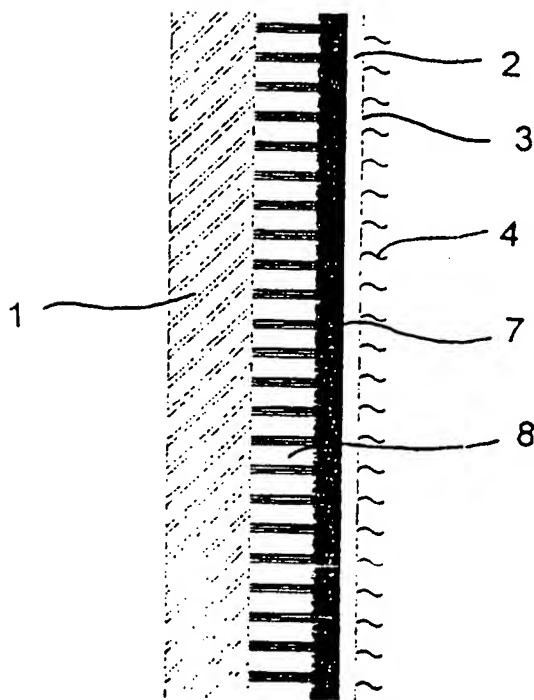


Fig. 2

2/4

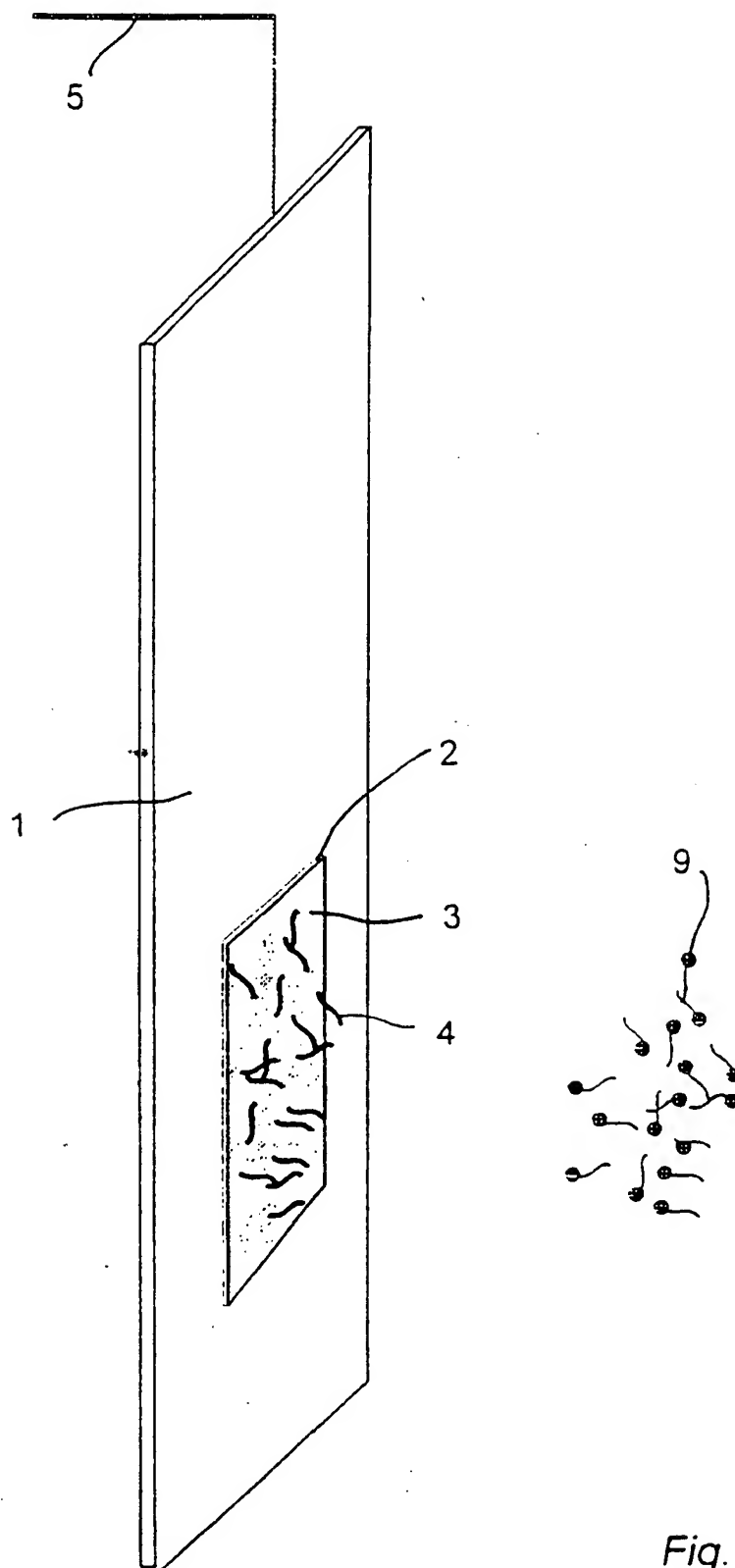


Fig. 3

3/4

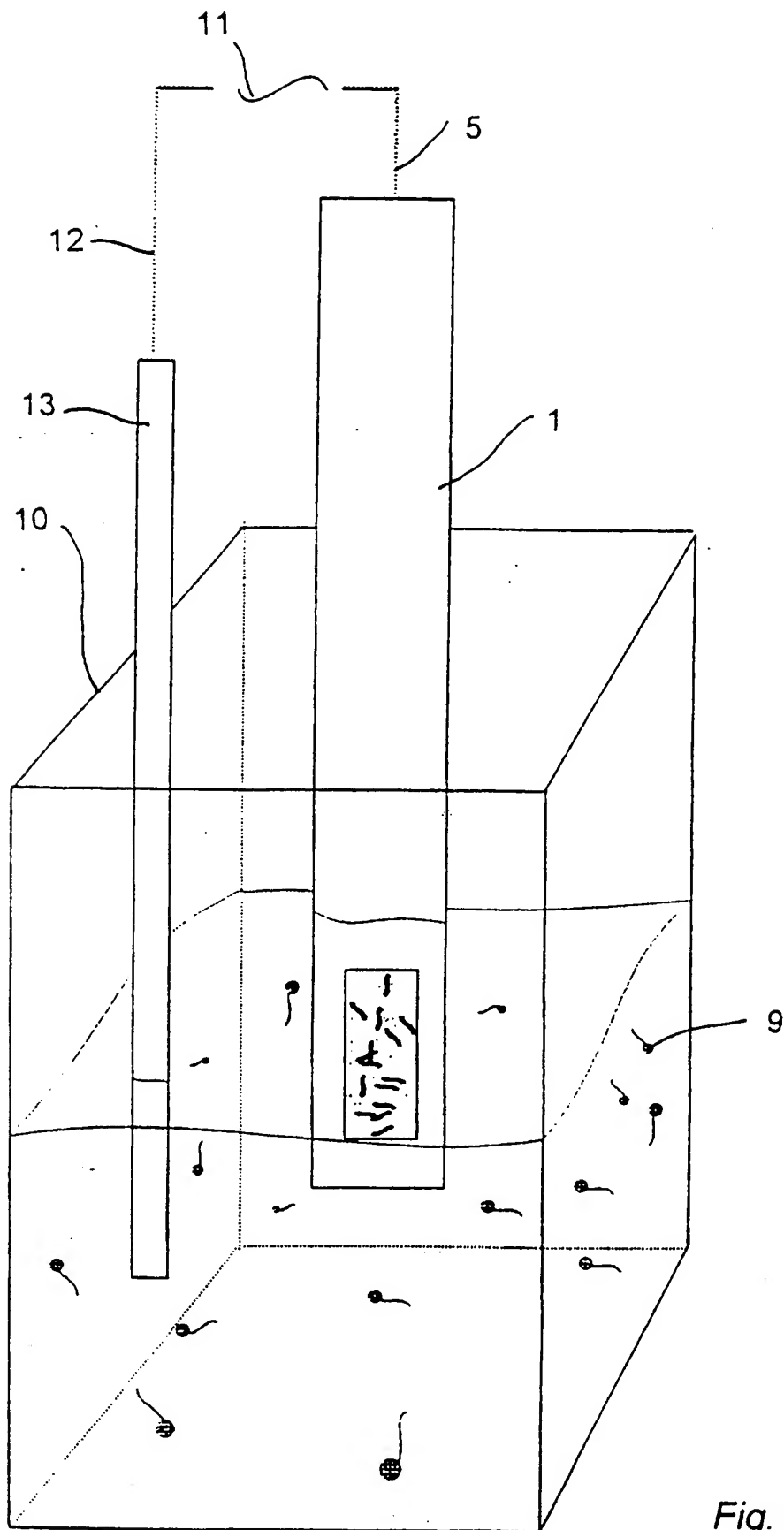
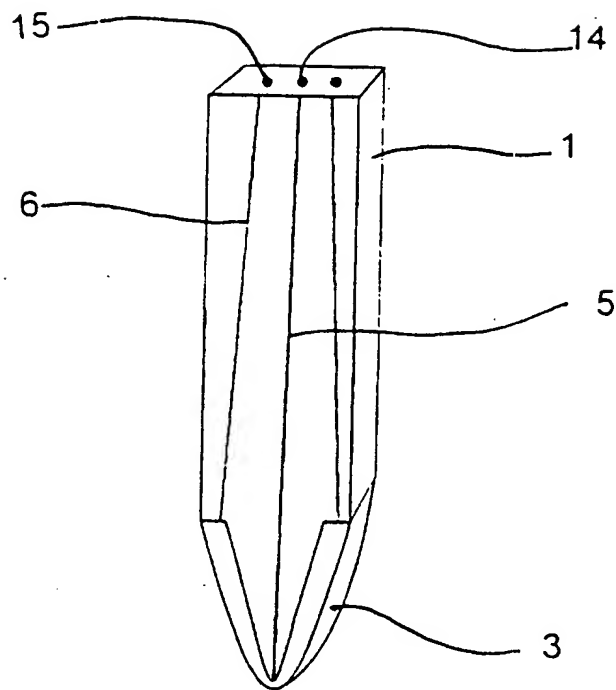


Fig. 4

*Fig. 5*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 97/01368

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07B63/00 C07H1/06 C07H19/20 C07H21/00 C07K1/14
C25B3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07B C07H C07K C25B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 217 593 A (MACCONNELL WILLIAM P) 8 June 1993 see abstract	1
A	US 5 196 099 A (MORI YUICHI ET AL) 23 March 1993 see abstract	1
A	US 5 151 165 A (HUYNH VAN T) 29 September 1992 see abstract	1
A	US 4 915 811 A (YAMAMOTO MASAYOSHI ET AL) 10 April 1990 see abstract	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 November 1997

Date of mailing of the international search report

21. 11. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
DE 97/01368

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 715 942 A (TEZUKA SIGERU ET AL) 29 December 1987 see abstract	1
A	US 4 545 888 A (WALSH J WILLIAM) 8 October 1985 see abstract	1
A	FR 2 687 931 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 3 September 1993 see abstract	1
A	WO 89 05454 A (NOVO BIOLABS LTD) 15 June 1989 see abstract	1
A	WO 94 25144 A (AMRAD CORP LTD ;SAUL ALLAN JAMES (AU); STOWERS ANTHONY (AU)) 10 November 1994 see claims 1,26	1
A	EP 0 031 565 A (UNIV CALIFORNIA) 8 July 1981 see abstract see claim 1	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/01368

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5217593 A	08-06-93	US 5139637 A	18-08-92
		EP 0649528 A	26-04-95
		WO 9401763 A	20-01-94
US 5196099 A	23-03-93	JP 3296657 A	27-12-91
		EP 0534017 A	31-03-93
		US 5164057 A	17-11-92
US 5151165 A	29-09-92	FR 2574311 A	13-06-86
		CA 1276589 A	20-11-90
		EP 0187586 A	16-07-86
		WO 8603427 A	19-06-86
		JP 62501033 T	23-04-87
US 4915811 A	10-04-90	JP 63317756 A	26-12-88
US 4715942 A	29-12-87	JP 1708074 C	11-11-92
		JP 3075822 B	03-12-91
		JP 62184343 A	12-08-87
		DE 3703687 A	13-08-87
US 4545888 A	08-10-85	NONE	
FR 2687931 A	03-09-93	EP 0627955 A	14-12-94
		WO 9316789 A	02-09-93
		JP 7507134 T	03-08-95
WO 8905454 A	15-06-89	AU 2820989 A	05-07-89
		EP 0391963 A	17-10-90
WO 9425144 A	10-11-94	AU 663260 B	28-09-95
		AU 6640394 A	21-11-94
EP 0031565 A	08-07-81	US 4290855 A	22-09-81
		US 4323439 A	06-04-82
		CA 1152449 A	23-08-83
		JP 56150344 A	20-11-81

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

CT/DE 97/01368

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07B63/00 C07H1/06 C07H19/20 C07H21/00 C07K1/14
C25B3/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07B C07H C07K C25B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 217 593 A (MACCONNELL WILLIAM P) 8.Juni 1993 siehe Zusammenfassung ---	1
A	US 5 196 099 A (MORI YUICHI ET AL) 23.März 1993 siehe Zusammenfassung ---	1
A	US 5 151 165 A (HUYNH VAN T) 29.September 1992 siehe Zusammenfassung ---	1
A	US 4 915 811 A (YAMAMOTO MASAYOSHI ET AL) 10.April 1990 siehe Zusammenfassung ---	1
-/-		

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. November 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21. 11. 97

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Scott; J

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

onales Aktenzeichen

CT/DE 97/01368

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 715 942 A (TEZUKA SIGERU ET AL) 29.Dezember 1987 siehe Zusammenfassung ---	1
A	US 4 545 888 A (WALSH J WILLIAM) 8.Oktober 1985 siehe Zusammenfassung ---	1
A	FR 2 687 931 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 3.September 1993 siehe Zusammenfassung ---	1
A	WO 89 05454 A (NOVO BIOLABS LTD) 15.Juni 1989 siehe Zusammenfassung ---	1
A	WO 94 25144 A (AMRAD CORP LTD ;SAUL ALLAN JAMES (AU); STOWERS ANTHONY (AU)) 10.November 1994 siehe Ansprüche-1,26 ---	1
A	EP 0 031 565 A (UNIV CALIFORNIA) 8.Juli 1981 siehe Zusammenfassung siehe Anspruch 1 -----	1

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

CT/DE 97/01368

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5217593 A	08-06-93	US 5139637 A EP 0649528 A WO 9401763 A	18-08-92 26-04-95 20-01-94
US 5196099 A	23-03-93	JP 3296657 A EP 0534017 A US 5164057 A	27-12-91 31-03-93 17-11-92
US 5151165 A	29-09-92	FR 2574311 A CA 1276589 A EP 0187586 A WO 8603427 A JP 62501033 T	13-06-86 20-11-90 16-07-86 19-06-86 23-04-87
US 4915811 A	10-04-90	JP 63317756 A	26-12-88
US 4715942 A	29-12-87	JP 1708074 C JP 3075822 B JP 62184343 A DE 3703687 A	11-11-92 03-12-91 12-08-87 13-08-87
US 4545888 A	08-10-85	KEINE	
FR 2687931 A	03-09-93	EP 0627955 A WO 9316789 A JP 7507134 T	14-12-94 02-09-93 03-08-95
WO 8905454 A	15-06-89	AU 2820989 A EP 0391963 A	05-07-89 17-10-90
WO 9425144 A	10-11-94	AU 663260 B AU 6640394 A	28-09-95 21-11-94
EP 0031565 A	08-07-81	US 4290855 A US 4323439 A CA 1152449 A JP 56150344 A	22-09-81 06-04-82 23-08-83 20-11-81

